高成功率PCR酵素『KOD FX』を用いた糸状菌からのコロニーPCR

東洋紡績（株）　敦賀バイオ研究所　歌島 悠

はじめに

『KOD FX』は、様々な優れた特性を有するPCR酵素『KOD DNA Polymerase』をベースに開発された高性能PCR試薬です。本酵素は、優れた「増幅成功率」を示し、血液や培養細胞、マウステールや植物サンプル（葉、米粒）から直接、もしくは、簡便な前処理にて調製したライセートをPCR反応液に添加するだけで、確実に増幅産物が得られることを確認しております。つまり、従来、サンプルからDNAを一旦精製してから行っていたようなPCR実験も、『KOD FX』を用いることによって、DNAの精製が不要になったり、簡単な前処理のみでPCR増幅が可能になります。

今回は、クルードかつ微量サンプルからの実施例として糸状菌コロニーからの簡便なPCR増幅を試みました。糸状菌は国内では"国菌"と称される*Aspergillus oryzae*のゲノム解析が2005年に完了、報告されたことを始め、高いタンパク質生産能力と安全性から、有用タンパク質の生産宿主としても期待されています。しかし、糸状菌からのコロニーPCRは、研究者の間では非常に困難であることが知られており、遺伝子のクローニング、遺伝子挿入位置の確認、などを行う場合には高純度のゲノムDNAを精製する必要がありました。そこで今回は、糸状菌のコロニーから菌体を回収し、『KOD FX』と簡便な前処理と組み合わせることによって、糸状菌コロニーから直接PCR増幅を行うことを試みました。以下、その方法及び結果をご紹介いたします。

方　法

（1）前処理（熱処理）

糸状菌（*Aspergillus oryzae*）を生育させたプレートから、爪楊枝で菌体を回収し、TE buffer 50μl に懸濁します。懸濁液をサーマルサイクラーで95℃, 10min熱処理を行った後、上清5μlをサンプルとしました。

（大過剰に菌体を回収すると増幅率が悪くなることがあります。回収する菌体量は少量で十分です。）

（2）PCR反応

PCR反応は、（1）で調製したサンプル5μlを直接PCR反応液に添加し、以下の条件にて実施しました。

①反応液組成

PCR grade water	6	μl
2x PCR buffer for KOD FX	25	μl
2mM dNTPs	10	μl
10pmol /μl Primer #1	1.5	μl
10pmol /μl Primer #2	1.5	μl
前処理サンプル	5	μl
KOD FX（1.0U/μl）	1	μl
Total reaction volume	50	μl

Target: ITS-1 150bp～470bp
Primer #1: GTAACAAGGT(T/C)TCCGT
Primer #2: CGTTCTTCATCGATG

②PCRサイクル

94℃, 2min.
↓
94℃, 30sec.
55℃, 1min　30 cycles
68℃, 1min

図1. *Aspergillus oryzae*のジャイアントコロニー
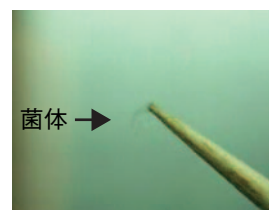
図2. 回収した*Aspergillus oryzae*の菌体

プレートに生育したコロニーから菌体を回収
（上図ご参照）
↓
50μlのTE bufferに懸濁し、95℃ 10min インキュベート
↓
卓上遠心機で遠心し、上清5 μlをPCR反応に使用

また、比較のためTaqベースの他社PCR酵素を用いて、取扱説明書推奨の条件にてPCRを実施し（サイクルは同じく30サイクル）、比較を行いました。

さらに、*Aspergillus oryzae*だけでなく、各種糸状菌、酵母に関しても同様の処理を行い、PCRを実施しました。

結果および考察
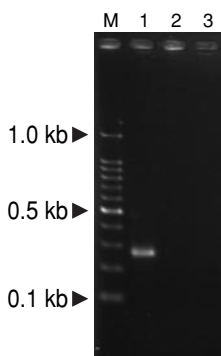
図3. *A.oryzae*コロニーからのPCR

M：100bp ladder
1：KOD FX
2：A社 高効率PCR酵素
3：B社 Long PCR酵素
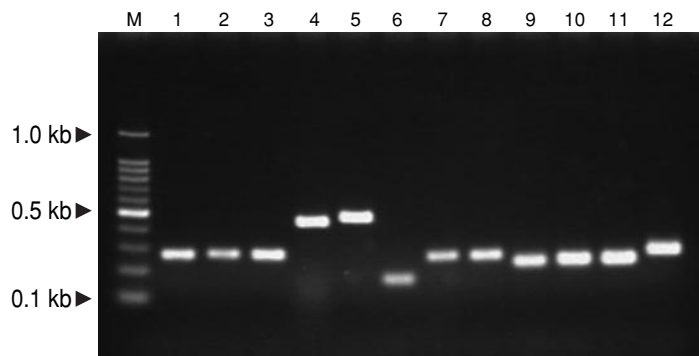
図4. 各種糸状菌・酵母コロニーからのPCR

M：100bp ladder
1：*Aspergillus oryzae*
2：*Aspergillus niger*
3：*Aspergillus terreus*
4：*Saccharomyces cerevisiae*
5：*Schizosaccharomyces pombe*
6：*Pichia pastris*
7：*Penicillium camemberti*
8：*Penicillium requeforti*
9：*Magnaporthe salvini*
10：*Schizophyllum commune*
11：*Sagenomella oligospora*
12：*Thysanophora penicillioides*

PCR産物は、2%アガロースゲルに5μlアプライして解析を行いました（図3）。その結果、KOD FXを用いた場合のみ、明瞭な増幅が確認できました。また、各種糸状菌、酵母を用いた場合でも、今回用いた12菌株全てで明瞭な増幅が確認できました（図4）。

糸状菌は核に加えて強固な細胞壁を持っており、ゲノムDNAを十分に溶出させるためには、凍結粉砕、界面活性剤による溶解などの操作を行う必要があります。しかしKOD FXを用いることにより、熱処理によって溶出した微量なDNAを鋳型としてPCRによる増幅が可能でした。これは、従来のTaqベースのPCR酵素と比較して、KOD FXがクルードサンプルに強いことに加え、増幅効率の点においても圧倒的に優れていることによるものと考えられました。

まとめ

糸状菌からのゲノムDNAの精製は、菌体の凍結粉砕、SDSによるDNAの溶出、フェノール、クロロホルム抽出による夾雑タンパク質の除去、RNase処理、アルコール沈殿による精製と多段階にわたるため、多数の検体を処理するには莫大な労力が必要となります。

一方、KOD FXを用いたコロニーPCRを行うことにより、ゲノムDNAの精製工程を省略することができ、生育した菌体から簡便・迅速にPCRを行うことができるようになります。糸状菌・酵母などの真菌類からのDNA実験をされる場合は、是非、一度お試しください。

マウステール、植物、微生物サンプルの実施例はこちら! → 1 弊社ウェブページ www.toyobo.co.jp/bio → 2 KOD FXコーナー

品名および内容	包　　装	保存温度	Code No.	価　　格
KOD FX KOD FX（1U/μl） 2×PCR Buffer for KOD FX 2mM dNTPs	200U×1本［200回用*］	-20℃	KFX-101	￥35,000
	（200U×1本）× 5［1,000回用*］	-20℃	KFX-101X5	￥140,000
	（200U×1本）×10［2,000回用*］	-20℃	KFX-101X10	￥260,000
2×PCR Buffer for KOD FX	1.7ml×3本	-20℃	KFX-1B	￥5,000

＊50 μl反応を行った時の反応回数を表示しています。
※KOD FXで増幅されたDNA断片は平滑化されているため、通常のTAクローニングはできません。TArget Clone™ -Plus-をお使いください。

関連商品

品　　名	包　　装	保存温度	Code No.	価　　格
KOD用高効率TAクローニングキット **TArget Clone™ -Plus-**	10回用	-20℃	TAK-201	￥16,000